

## طريقة جديدة لمعايرة السيبترامين في الأشكال الصيدلانية باستخدام تقنية الاستشراب السائل عالي الأداء

باسمة كبيج\*\*

جمعة الزهوري\*

### الملخص

هدف الدراسة: لاشك أن تطوير طرائق تحليلية جديدة تمكن من مراقبة الأدوية في أشكالها الصيدلانية، ولاسيما تلك التي لم يدرج لها حتى حينه طريقة تحليلية معتمدة في دساتير الأدوية، يعد حجر الأساس في الوصول إلى مستحضر صيدلاني آمن وفعال. من هنا كان الهدف من بحثنا هو تطوير طريقة نوعية وحساسة لمعايرة مادة السيبترامين في المحافظ Capsules.

طرائق الدراسة: وقد اعتمدت منهجية البحث على استخدام تقنية الاستشراب السائل عالي الأداء HPLC حيث تم فصل المادة باستخدام عمود ستانلس ستيل (25 سم 4 X ملم) من نمط Rp18. وطور متحرك مكون من الميثانول والماء وثلاثي إيثيل الأمين بنسبة 1/15/84 على التوالي. وأستُخدم متحري الأشعة فوق البنفسجية وذلك عند طول موجة 225 نم.

\* أستاذ - قسم الكيمياء التحليلية الصيدلانية والغذائية - كلية الصيدلة - جامعة دمشق.

\*\* كيميائية - قسم الكيمياء التحليلية الصيدلانية والغذائية - كلية الصيدلة - جامعة دمشق.

---

تمّ تحضير سلسلة عيارية للسييوترامين ومن ثمّ حقن المحاليل في جهاز الHPLC فأبدت قيم مساحات القمم التي حصلنا عليها مقابل التركيز خطأ مستقيماً ضمن المجال 120-600 نغ/مل.

النتائج: طبقت الطريقة المطوّرة بنجاح لمعايرة السييوترامين في مستحضر راديكال كبسول Radical التابع لشركة دياموند للصناعات الدوائية في الجمهورية العربية السورية، وكانت نسبة المردود والانحراف المعياري (n=10)  $100.2 \pm 1.1\%$

الخلاصة: إنّ حساسية الطريقة التي حصلنا عليها تصلح لمعايرة السييوترامين في المصل.

الكلمات المفتاحية: السييوترامين، محافظ، استشراب سائل عالي الأداء، جهاز الطيف فوق البنفسجي.

---

## A New Method for the Determination of Sibutramine in Dosage Form Using High-Performance Liquid Chromatography

Joumaa Al-Zehouri\*

Basema Kjeje\*\*

### Abstract

**Objective:** Without any doubt, the development of new analytical methods are helpful in drugs control in pharmaceutical dosage form, especially if these drugs don't have till now standard analytical method in Pharmacopeia's.

New suitable analytical methods are very important and helpful power to achieve save and active drugs, therefore the aim of our research was the development of anew specific and sensitive analytical method for the determination of Sibutramine in capsules using HPLC technique.

**Methods:** The substance was separated on stainless steel column Rp 18 (25 X 4 mm) and the use of Methanol, Water and Treethylamin (84/15/1) respectively as mobile phase, using UV – Detector at 225 nm.

Standard series of Sibutramine was prepared and injected in HPLC instrument .The relation between the peaks area and Concentrations was rectilinear over the range 120-600 ng/ml

**Results:** The proposed HPLC method was successfully applied to the determination of Sibutramine in Commercial product Capsules (Radical®) diamond pharm. - SAR , The percentage recoveries and the standard division (n=10) were  $100.2 \pm 1.1 \%$

**Conclusion:** The sensitivity of the proposed method have the ability to determine the Sibutramine in human serum .

**Key word :** Sibutramine , Capsules , HPLC , Rp18 , UV-spectrophotometer

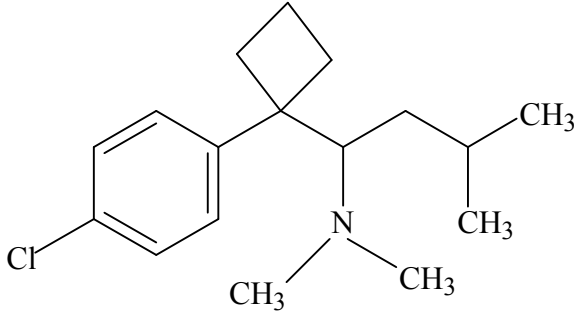
\*Prof. Dept. of. Pharmaceutical analytical chemistry- College of Pharmacy- Damascus University.

\*\*Chemist, Pharmaceutical analytical chemistry- College of Pharmacy- Damascus University.

### المقدمة Introduction:

حد أقل الدوبامين Dopamine في النهايات العصبية قبل المشبكية Presynaptic nerue terminals مما يؤدي إلى زيادة تركيز كل من السيروتونين والنورايبينفرين في الفراغ المشبكي Synaptic cleft على مستوى الجملة العصبية المركزية CNS، وهو بذلك يؤثر كمثبط للشهية حيث ينتاب المرضى احساس سريع بالشبع لدى تناول الطعام، فضلاً عن إحداثه تبادلاً كبيراً في الطاقة نتيجة زيادة الفعالية الأستقلابية (3,2,1)

ينتمي السيوترامين إلى زمرة الأدوية المثبطة لعود التقاط السيروتينين Serotonin reuptake inhibitors ولهذا فهو يستخدم كدواء مضاد للبدانة antiobesity أو مثبط للشهية appetite Suppressant حيث يتم العلاج به بجرعة أحادية قدرها 10 ملغ /يوم ترتفع لتأخذ حدها الأقصى 15 ملغ /يوم، بعد أربعة أسابيع. يعتمد السيوترامين في آلية تأثيره في تثبيط عود التقاط السيروتونين وكذلك النور ايبينفرين Norepinephrine وإلى



$C_{17}H_{26}ClN.HCl.H_2O$   
(CAS 106650-56-0)

Sibutramine Hydrochloride monohydrate (4)

مادة السيبوترامين هي مسحوق بلوري أبيض تنحل في الميثانول وثنائي متيل الفورم أميد في حين أنّ مجال انصهارها 190-201 درجة مئوية (4)، والواقع أنّ هذه المادة ليست مادة دستورية إذ إنّها حتى تاريخه لم تتدرج بأي دستور دوائي ولهذا فإنه حتى الآن لم يتوافر لهذه المادة طريقة دستورية لمعايرتها لا كمادة أولية ولا في أشكالها الصيدلانية، وحتى في المراجع العالمية فإنه لم يتوافر سوى ثلاثة طرائق لمعايرته إحداهما اعتمدت على استخدام تقنية LC-MS (5,6,7,8,9,10,11) والثانية على استخدام تقنية Chiral Chromatography (12) وأخرى باستخدام تقنية GC-MS (13).

إنّ الهدف من بحثنا هذا هو تطوير طريقة تحليلية دقيقة وحساسة تعتمد على إحدى التقنيات المتوافرة لدينا، وهي أجهزة الطيف الضوئي أو أجهزة الاستشراب السائل عالي الأداء المزودة بكاشف الأشعة فوق البنفسجية HPLC تصلح لمعايرة السيبوترامين بأشكاله

الصيدلانية، وتتمتع بحساسية كافية لتطبيقها في المصل مستقبلاً.

**المواد Material:**

- المواد العيارية Standards Substances

• سيبوترامين هيدروكلوريد Sibutramine Hydrochloride مادة عيارية من شركة BDR العالمية للمواد الصيدلانية، رقم الطبخة SB/09/04/022.

( BDR Pharmaceuticals Intl.PVT.lted.India )

- المواد الكيميائية: Chemical Substances

ميثانول L.C Methanol من شركة ميرك الألمانية.

ماء معدّل L.C HPLC Water من شركة ميرك الألمانية.

ثلاثي إيتيل الأمين TEA من شركة ميرك الألمانية.

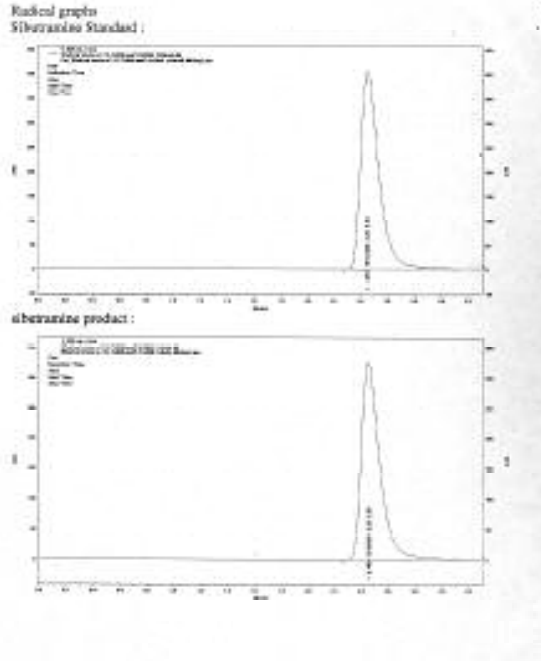
حمض الفوسفور Phosphoric acid من شركة BDH البريطانية.

الأشكال الصيدلانية Dosage Forms:

- مستحضر راديكال® Radicals التابع لشركة دياموند للصناعات الدوائية- Diamond pharma الجمهورية العربية السورية، على شكل محافظ Capsules 5 ملغ رقم الطبخة No.003.
- جهاز استشراب سائل عالي الأداء High performance liquid chromatography HPLC L-2450 Merck Hitachi ( elite la chrom) الجهاز تصنيغ شركة ميرك - ألمانيا
- عامود ستانلس ستيل من نمط Rp 18 (25 سم X 4 ملم ) 5 ميكروميتر من شركة ميرك اسمه التجاري LiChrospher 100.
- مراشح سيللوزية 0,45 ميكرو ميتر إنتاج شركة سارتيريووز .
- جهاز امتصاص الطيف الضوئي موديل CE7200 التابع لشركة Cecil البريطانية مع instrument,Limited,England استخدام خلايا كوارتز 1 سم.
- جهاز أمواج فوق صوتية Ultrasonics من نوع Crest موديل SDN.BHD 5750 AE التابع لشركة Malaysia الماليزية .
- تحضير المحاليل:**
- تحضير محلول الطور المتحرك Mobil Phase : يتألف الطور المتحرك من مزيج من الميثانول /الماء/ ثلاثي ايتيل أمين (85 15/ 0.3/ مل لكل 100 مل) حيث تضبط درجة ال pH على 5,2 باستخدام حمض الفوسفور 85% حيث يرشح المزيج ويطرد الغاز منه.
- تحضير المحلول العياري:
- يوزن 60 ملغ من مادة سبيوترامين هيدروكلوريد أحادي الماء Sibutramine hydrochloride monohydrate (مادة عيارية) وتوضع في بالون معايير سعة 100 مل ثم تحل ب 50 مل من الطور المتحرك وتترك 10 دقائق في جهاز الأمواج فوق الصوتية ثم تمدد ل 100 مل بالمحلول نفسه حيث يؤخذ 1 مل من هذا المحلول وينقل إلى بالون معايير سعة

- 100 مل ويمدد بالطور المتحرك لخط العيار.
  - العا مود المستخدم Column ستانلس ستيل (25 سم X 4 ملم) نمط Rp18 بأبعاد 5 ميكرومتر.
  - المتحري (الكاشف) Detector: متحري أشعة فوق بنفسجية عند الموجة 225 نم.
  - سرعة الطور المتحرك Flow rate 1,2 مل/د.
  - حرارة الفرن Oven temperature: هي درجة حرارة الغرفة Room Temperature
  - حجم العينة Sample Volume: 10 ميكروليتر.
  - نظام الضخ Pump system: نظام ضخ أحادي Isogradient.
  - زمن التحليل Run Time: 3.30 دقيقة.
  - النتائج Results: أُجريت العمل وفق الشروط المذكورة أعلاه فحصلنا على فصل جيد للسيبوترامين يوضحه الشكل (1) ويبين القسم العلوي من الشكل مخطط فصل المادة العيارية من السيبوترامين هيدروكلوريد، في حين يوضح الشكل السفلي مخطط فصل السيبوترامين
- 100 مل ويمدد بالطور المتحرك لخط العيار.
- تحضير محاليل السلسلة العيارية: يؤخذ على التوالي 1،2،3،4،5 مل من المحلول العياري كل على حدة وتمدد ل 50 مل بالطور المتحرك.
- تحضير محلول العمل على المحافظ (Capsules) يفرغ محتوى 20 محفظة في وعاء مناسب ثم نمزج جيداً ونأخذ ما يكافئ 4.8 ملغ من المادة الفعالة وتوضع في بالون معايير سعة 100 مل ويضاف 50 مل من الطور المتحرك ثم توضع في جهاز الأمواج فوق الصوتية مدة 10 دقائق، وبعد تمام الحل تمدد بالطور المتحرك لخط العيار حيث نأخذ 1 مل ونمدد ل 100 مل بالطور المتحرك، ثم نرشح عبر مرشحة 0.45 ميكرومتر، حيث ترمى أول 10 مل من الرشاحة ويؤخذ الباقي للحقن بالجهاز.
- شروط العمل على جهاز ال HPLC Chromatographic Conditioning**

للمستحضر الصيدلاني ويظهر من الشكل للسيوترامين هو 2.46 دقيقة، وأن الزمن (1) أن زمن الاحتباس Retention time الكلي للتحليل استغرق 3.30 دقيقة فقط .

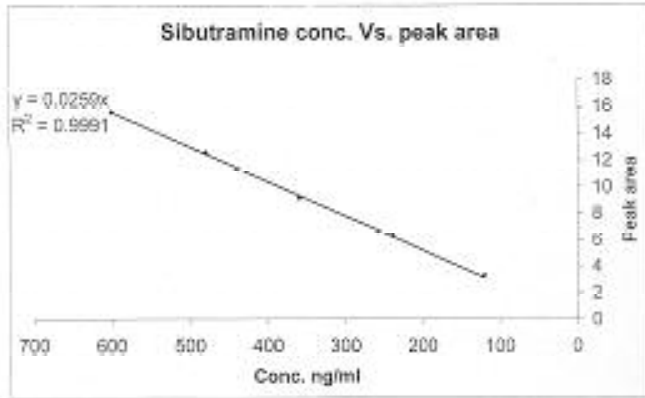


الشكل (1) : قمة فصل السيوترامين (480 نغ/مل) بجهاز ال HPLC لكل من العياري ( الشكل العلوي) والمستحضر الصيدلاني ( الشكل السفلي ) .

ومن خلال قيم متوسط مساحات القمم للسيوترامين التي حصلنا عليها ومقارنتها مع التركيز (الجدول 1) حصلنا على علاقة خطية واضحة يمثلها الشكل (2).



التركيز / مل	متوسط مساحات القمم للسيبوترامين
120	3.292216
240	6.271145
360	9.126421
480	12.541232
600	15.532416



الشكل (2) العلاقة الخطية بين التركيز للسيبوترامين ومساحات القمم للسلسلة العيارية.

وللتأكد من صلاحية الطريقة التي قمنا النتائج كما في الجدول (2) تتمتع بدقة بتطويرها قمنا بتطبيق هذه الطريقة على Precision وصحة Accuracy كافيتين: عينات عيارية من السيبوترامين فكانت الجدول (2):

الكمية المأخوذة مكغ/مل	الكمية المكتشفة مكغ/مل	المردود %
120	122	101.6
240	238	99.1
360	361	100.2
480	483	100.6
600	598	99.6
% 1.1 ± 100.2		

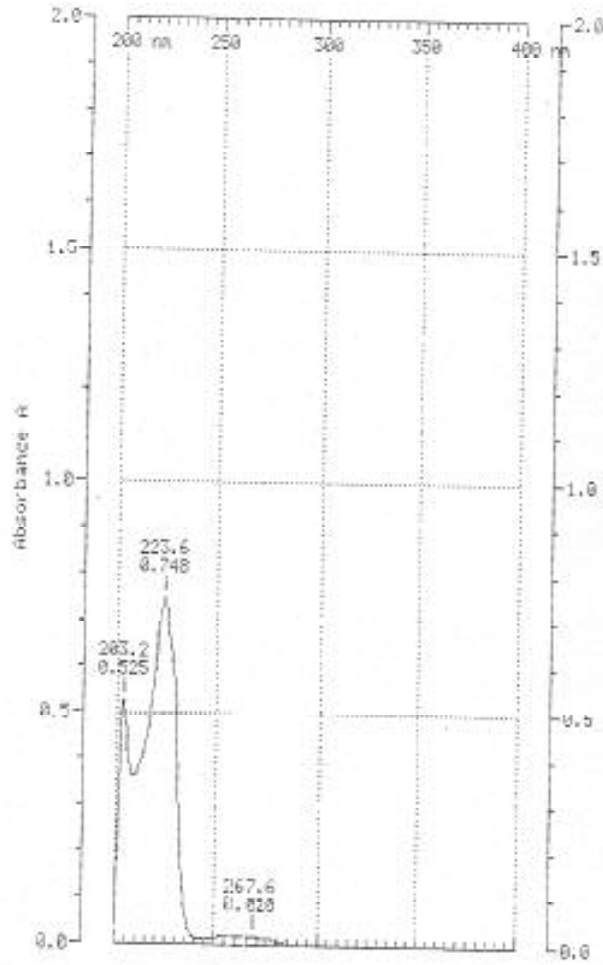
طُبِّقَتِ الطَّرِيقَةُ عَلَى الْمُسْتَحْضَرِ بِالْجَدْوَلِ (3) ذَاتِ دَقَّةٍ وَحَسَاسِيَّةٍ وَمَرْدُودِ الصِّدْلَانِيِّ رَادِيكَالٍ<sup>®</sup> Radical، وَكَمَا يُوَضِّحُ الشَّكْلَ (1) لَمْ نَلَاظْ وَجُودَ أَيِّ تَدَاخُلٍ لِلسَّوَاعَاتِ، وَكَانَتِ النَّتَائِجُ كَمَا الْمَوْصُوفَةُ لِمَعَايِرَةِ السِّبِّيُوتْرَامِينِ فِي الْمُسْتَحْضَرِ الصِّدْلَانِيِّ:

اسم المستحضر	اسم المادة	المردود المئوي والانحراف المعياري *
راديكال <sup>®</sup> Radical لشركة Diamond pharm رقم الطبخة	سيبترامين	99.4 ± 1.8 %

\* n=10

#### المناقشة Discussion:

كان هدفنا هو تطوير طريقة تحليلية لمعايرة السيبترامين بداية في أشكاله الصيدلانية ومن ثم في مصل الإنسان، ولذلك حاولنا أن نطور طريقة تعتمد على استخدام الخصائص الضوئية التي يتمتع فيها السيبترامين وذلك باستخدام أجهزة الطيف الضوئي لمعايرة السيبترامين في أشكاله الصيدلانية، ولهذا قمنا بعمل مسح طيفي للسيبترامين فوجدنا أن المادة أبدت امتصاصا واضحا عند طول الموجة 223.6 نم كما يوضحها الشكل (3)، في حين أن متوسط قراءات موجة الامتصاص الأعظمي لطبختنا مختلفة من المواد الأولية كان 225 نم وهي الموجة التي اعتمدت للقراءة.



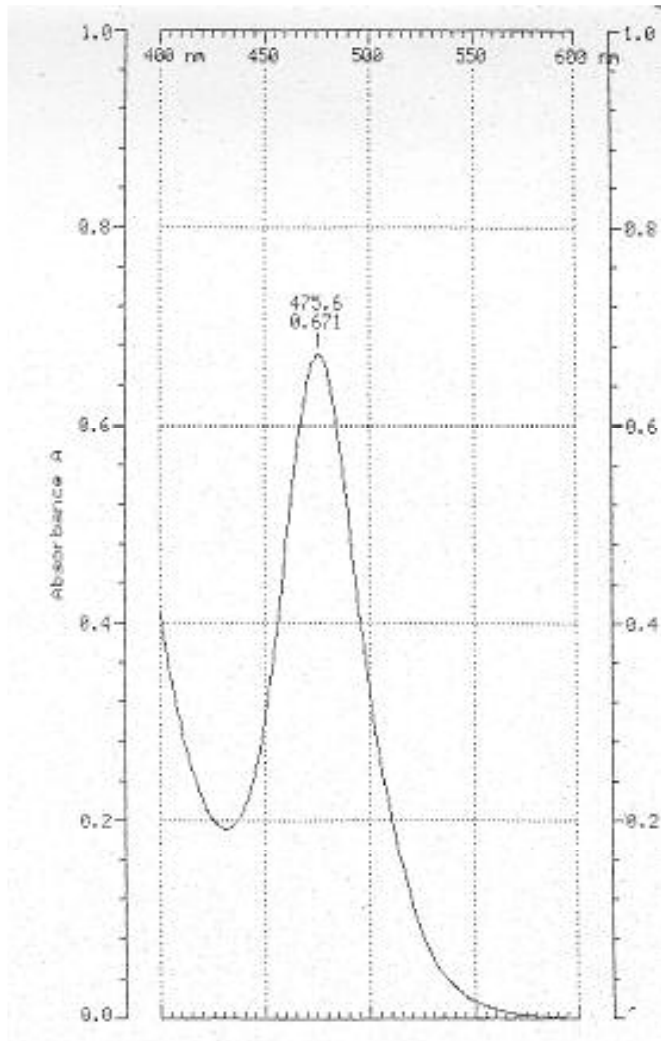
الشكل (3): المسح الطيفي للسبيوترمين (0.002 %) في الميثانول

وكان هذا الامتصاص كافياً لمعايرة العلاقة ما بين التركيز والامتصاص السبيوترامين كمادة أولية، حيث كانت علاقة خطية تعطي بالعلاقة:

$$Y=355.84 X$$

حيث  $Y$  تعبر عن الامتصاص و  $X$  تعبر عن التركيز للسيوترامين معبراً عنه ب غرام % .  
وعندما طبقنا هذه الطريقة على الشكل الصيدلاني لمعايرة السيوترامين حدث تداخل في السواغات الأمر الذي حال دون اعتماد هذه الطريقة لمعايرة السيوترامين بشكله الصيدلاني. وإنما فقد لمعايرة المادة الأولية.  
بعد ذلك لجأنا إلى عملية الاشتقاق الكيميائي وذلك بالتركيز على مجموعة الأمين الثالثة التي تملكها صيغة السيوترامين والتي حاولنا الاستفادة منها وذلك بتطبيق معظم التفاعلات الخاصة

بها والتي يفترض أن تقود إلى مركب ملون يستفاد منه لمعايرته لونياً وفعالاً فقد حققنا نجاحاً بالحصول على معقد ملون بلون أصفر نتيجة مفاعلة السيوترامين مع كاشف 4-Nitrobenzediazoniumtetrafluoroborate وقد أعطى المركب الجديد امتصاصاً أعظماً عند الموجة 475 نم (الشكل 4)، ولكن العلاقة مابين التركيز والامتصاص لم تكن خطية، على الأقل بعد انتظار وصل إلى نصف ساعة على هذا التفاعل. وهذا ما جعلنا نعزف عن هذه الطريقة.



شكل (4) : قمة امتصاص السيوترامين ( 0.1 غ%) بعد اشتقاقه بمادة 4- نيتروبنزن دي أونيوم رباعي فلورو بورات .

نتيجة هذه الظروف كلها ونظراً لعدم توافر التقنيات العالمية المستخدمة في المعايرة وهي كما سبق وأشرنا إليها سابقاً تقنية LC-MS، لهذا انتقلنا إلى تقنية ال HPLC، وكما ذكرنا في مقدمة البحث فإن السيوترامين ليست مادة

#### الاستنتاج Conclusion:

دستورية وليس لها طريقة دستورية لمعايرتها، كما أننا لم نجد في المراجع العالمية طريقة لمعايرة هذه المادة تعتمد على استخدام متحري الأشعة فوق البنفسجية في جهاز ال HPLC الشائع في معظم المخابز ولهذا قمنا بتطوير الطريقة التي وصفت في هذا البحث وهي طريقة جديدة تماماً وأصيلة وذات حساسية عالية ومردود جيد، كما وفرت لنا الطريقة حساسية عالية

#### كلمة شكر Acknowledgement:

Sensitivity جداً لمعايرة السيوترامين بمجال النانوغرام، الأمر الذي سوف يساعدنا في معايرة هذا الدواء في المصل بحيث نستطيع اعتماد هذه الطريقة مستقبلاً في مجال رصد هذا الدواء في

المصل Drug Level Monitoring وإمكانية متابعة الدراسات السريرية

للسيوترامين إذ إن الجرعة اليومية 10 ملغ الدواء يعطى عن طريق الفم ومن ثم فإن 10% سوف يمتص، وهذا يعني أن التركيز بالمصل سيكون بحدود 200 نغ/مل، وهذا التركيز يقع ضمن مجال الخط العياري الذي حصلنا عليه .

إن طريقة الأستشراب السائل عالي الأداء الموصوفة في البحث لمعايرة السيوترامين في أشكاله الصيدلانية تعد طريقة بسيطة وحساسة وذات مردود ودقة عاليين، ويمكن تطبيقها بسهولة لمراقبة هذه المادة في أشكالها الصيدلانية، ونوصي بمتابعة تطبيقها بالمصل نظراً لحساسيتها العالية.

يتقدم الباحث بالشكر الجزيل للسيد أحمد الأشقر المدير العام لشركة دياموند للصناعات الدوائية لتشجيعه الدائم على إجراء البحوث العلمية في مختبرات شركته.

## References

- 1- Richard D. Howland and Mary J. Mycek Lippincott's Illustrated Reviews : Pharmacology 3<sup>rd</sup> edition Lippincott Williams and Wilkins, 2006
- 2- Budd GM.; Hayman LL .; Crump E., Pollydore C.; Hawleky KD.; Cronquist JL and Berkowitz RL. Weight loss in obese African American and Caucasian adolescents: secondary analysis of a randomized clinical trial of behavioral therapy plus Sibutramine. J.Cardiovasc Nurs. 22 (2007) 288-296
- 3- Berkowitz R.; Fujioka K.; Daniels SR. et al Effect of Sibutramine treatment in obese adolescents : a randomized trial .Ann Intern Med . 145 (2006) 81-90
- 4- Editorial Staff The Merck index Merck & CO ., INC. 2001
- 5- Chen, J ; Lu , W. ; Zhang, Q. and Jiang, X. Determination of the active metabolite of Sibutramine by Liquid Chromatography-electrospray ionization tandem mass Spectrometry. Journal of Chromatography B. 785 (2003) 197-203
- 6- Zohreh Abolfathi , Jean Couture, Francois Vallee, Mare Le Bel, Mario Tanguay and Eric Masson A pilot study to evaluate the pharmacokinetics of Sibutramine in healthy subjects under fasting and fed conditions. J.Pharm Pharmaceut Sci , 7 (3) (2004) 345 -349
- 7- Bhatt J.; Shah B.; Kambli S.; Singh S.; and Ameta S. Rapid and sensitive method for the determination of Sibutramine active metabolites in human plasma by reversed-phase liquid chromatography-tandem mass spectroscopy. J.Chromatogr Sci. 45 (2007) 91-96
- 8- Jain DS ; Subbaiah G.; Sanyal M.; Shrivastav PS; Pal U.; Ghataliya S.; Kakad A.; Patel H and Shah S. Liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry validated method for the simultaneous quantification of Sibutramine and its primary and secondary amine metabolites in human plasma and its application to a bioequivalence study. Rapid Commun Mass Spectrom, 20 (2006) 3509 – 3521
- 9- Link M.; Hakala K S; Wsol V.; Kostianen R. and Ketola RA. Metabolite profile of Sibutramine in human urine : a liquid chromatography – electrospray ionization mass spectrometric study. J.Mass Spectrom, 41 (2006) 1171 -1178

- 10- Thevis M.; Sigmund G.; Schiffer AK; and Schanzer W. Determination of N-desmethyl- and N-bisdesmethyl metabolites of Sibutramine in doping control analysis using liquid chromatography- tandem mass spectrometry. Eur J Mass Spectrom . 12 (2006) 129-136
- 11- Detection of Sibutramine, its two metabolites and one analogue in a herbal product for weight loss by liquid chromatography triple quadrupole mass spectrometry and time -of-flight mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom , 21 (2007) 614-618
- 12- Radhakrishna, T.; Narayana , C.L.; Rao DS; Vyas, K. and Reddy , G.O. LC method for the determination of assay and purity of Sibutramine hydrochloride and its enantiomers by chiral Chromatography. J.Pharm.Biomed Anal. 4 (2000) 627-39
- 13- Strano-Rossi S. ; Colamonici C. ; and Botre F. Detection of Sibutramine administration : a gas chromatography/mass spectrometry study of the main urinary metabolites. Rapid Commun Mass Spectrom . 21 (2007) 79-88

تاريخ ورود البحث إلى مجلة جامعة دمشق: 2006/6/18.

تاريخ قبوله للنشر: 2008/4/28.